

**JP61268628**

Publication Title:

**PRODUCTION OF LIPOSOME HAVING SURFACE COATED WITH NATURALLY OCCURRING POLYSACCHARIDE DERIVATIVE CONTAINING FAB' FRAGMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY LINKED THERETO**

Abstract:

Abstract of JP61268628

**PURPOSE:**A liposome obtained by covalently bonding a specific fragment of a monoclonal antibody to a polysaccharide of the liposome coated with a naturally occurring polysaccharide derivative. **CONSTITUTION:**A Fab' fragment of a monoclonal antibody is covalently bonded to a polysaccharide of a liposome, e.g. having the liposome membrane constituted of a lipid or lipid and cholesterol, etc., having the surface coated with a naturally occurring polysaccharide derivative, e.g. pullulan, amylopectin, amulose, etc., particularly dextran, to give the aimed liposome, having a sufficient amount required of the monoclonal antibody having a relatively high molecular weight thereto without deteriorating the structural stability of the individual liposome, and capable of overcoming the structural instability and the low cellular recognition property at the same time. **USE:**The use of the liposome is further extended as a histotropic drug transporter in treatment and diagnosis of diseases. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

*This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.*

Patent provided by Sughrue Mion, PLLC - <http://www.sughrue.com>

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-268628

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)11月28日

A 61 K 39/395

8214-4C

39/44

8214-4C

// A 61 K 9/00

6742-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 モノクロナール抗体のFab'フラグメントを結合した天然由来多糖誘導体により表面を被覆したリポソームの製造法

⑯ 特 願 昭60-106863

⑰ 出 願 昭60(1985)5月21日

⑱ 発明者	砂 本	順 三	長崎市横尾4-16-10
⑱ 発明者	佐 藤	智 典	長崎市江里町10-16
⑱ 発明者	石 井	伸 子	長崎市金堀町209番地の94
⑱ 発明者	小 路	敏 彦	長崎市江里町3-8
⑰ 出願人	砂 本	順 三	長崎市横尾4-16-10
⑰ 出願人	佐 藤	智 典	長崎市江里町10-16
⑰ 出願人	石 井	伸 子	長崎市金堀町209番地の94
⑰ 出願人	小 路	敏 彦	長崎市江里町3-8
⑲ 代理人	弁理士 内 田	明	外1名

明 細 書

1. 発明の名称

モノクロナール抗体のFab'フラグメントを結合した天然由来多糖誘導体により表面を被覆したリポソームの製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) 天然由来多糖誘導体で表面を被覆したリポソームの多糖類にモノクロナール抗体のFab'フラグメントを共有結合させたことを特徴とするリポソームの製造法。
- (2) リポソーム膜が脂質または脂質とコレステロールより構成されるリポソームである特許請求の範囲第1項記載のリポソームの製造法。
- (3) 脂質がホスファチジルコリンである特許請求の範囲第2項記載のリポソームの製造法。
- (4) 天然由来多糖類がプルラン、アミロペクチン、アミロース、デキストラン、およびマンナンから成る群より選択される少なくとも1

種である特許請求の範囲第1項記載のリポソームの製造法。

- (5) 天然由来多糖類がプルラン、アミロペクチン、アミロース、デキストラン、およびマンナンから成る群のいずれかの100単糖あたり4.0-5.0の第1級アルコール基がアミノエチルアミノカルボニル基で置換され、そのアミノエチルカルボニルメチル基の100基あたり10-50がコレステリルオキシカルボニル基により、また35-65がγ-マレイミドブチリル基(GMB基と呼ぶ)により置換されているものからなる群より選択される少なくとも1種である特許請求の範囲第1項または第4項記載のリポソームの製造法。
- (6) 天然由来多糖類が、プルラン、アミロペクチン、アミロース、デキストランおよびマンナンからなる群のいずれかの第1級アルコール基の0.35-0.65%に置換されているγ-マレイミドブチリルアミノエチルアミノカルボニルメチル基の0.1-5.0%に、ほ乳動物か

ら產生されたモノクローナル抗体のFab'フラグメントを共有結合させた群より選択される少なくとも1種である特許請求の範囲第1項、第4項、または第5項記載のリボソームの製造法。

### 3. 発明の詳細な説明

天然由来脂質を水中に再分散させたときに形成されるリボソームは、その構造特性に由来して薬物運搬体としての利用に期待がかけられて来た。しかるに過去20年間に渡る世界各国でのこの分野での莫大な量の基礎研究にも拘らず、実用化に際して耐え得る成果はほとんど得られていないと言っても過言ではない。その理由として現在2つの問題が掲げられている。即ち第1は、リボソームが元来非共有結合性相互作用による天然脂質のアッセンブリーであることのために生体適合性は良好であっても、実用化に際して要求される高い構造安定性が保証され得ないことである。第2は、リン脂質またはリン脂質とコレステロールのみから形成され

性は大きく向上せしめたとしても、医薬用材料として要求される生物分解性、毒性、および抗原性については極めて大きな不安が残る。本発明者はこのような一見二律相反する課題を克服すべく研究を重ね、天然由来脂質から形成されるリボソームの表面を天然由来多糖誘導体で非共有結合相互作用により被覆する方法を既に開発し、リボソームの安定性を得るという該目的を達成させた。(特願昭59-189748参照)

第2の課題については、(1) ハプテン化脂質の合成とそれを用いたリボソームによる抗原性の発現、(2) 抗体結合脂質の合成とそれによるリボソームの形成、(3) 抗原性タンパクのリボソーム表面への結合、および(4) 極めて消極的方法論ではあるがリボソームを形成させる脂質の疎水性の調節、リボソーム表面荷電の調節並びにリボソームのサイズの調節等による方法等が検討されて来た。しかるにいずれも、脂質の化学修飾の困難さ、抗原性タンパクのような巨大分子の低分子脂質への結合の故に、形

るリボソームでは、薬物運搬体に対する要求特性として最も重要である特異的細胞または組織指向性が殆ど発現されないことである。

第1の課題の解決の方法としては、これまでも(1) 重合性脂質を人工的に合成し、これによりリボソームを形成後、光または重合開始剤の添加により重合させ、所謂高分子化リボソームを形成させる方法、(2) イオン性脂質により予め形成されたりリボソームの表面にその反対荷電を有するイオン性モノマーを吸着させ、適当なる重合開始機構によりリボソーム表面で重合しポリマーネットを形成させる方法、(3) 通常の脂質リボソームの表面に、別のポリマーを吸着させ人工細胞壁を付与する方法、(4) 構成脂質そのものの化学構造を変え脂質間相互作用を向上させることによりリボソームの機械的強度を増加させる方法等が試みられてきた。しかるに(3)の方法を除いては、いずれも人工的に合成したポリマーまたは脂質を用いるため、たとえ得られたリボソームの構造安定

成されたりリボソームの構造不安定性、並びに組織または細胞認識性の低さといった欠点を完全に克服しえなかった。本発明者らは、従来提唱されて来たいくつかの方法論を慎重に検討し、全く新しい発想のもとに、既にリボソームの構造安定法として成功していた天然由来多糖誘導体で被覆したりリボソームの表面にモノクローナル抗体のFab'フラグメントを共有結合させることにより比較的分子量の大きいモノクローナル抗体の必要充分量をリボソーム自体の構造安定性を損なうことなく結合させる方法を開発し、上で述べたりリボソームの2大欠点、即ち、構造の不安定性と細胞認識性の低さを同時に克服する事に成功し、本発明を完成させるに至った。

#### [発明の構成]

##### 1. コレステロールを修飾した多糖類の合成

リボソーム表面の非共有結合性相互作用による水溶性多糖類の被覆効果を高め且つリボソームの構造強化を達成させるためにコレス

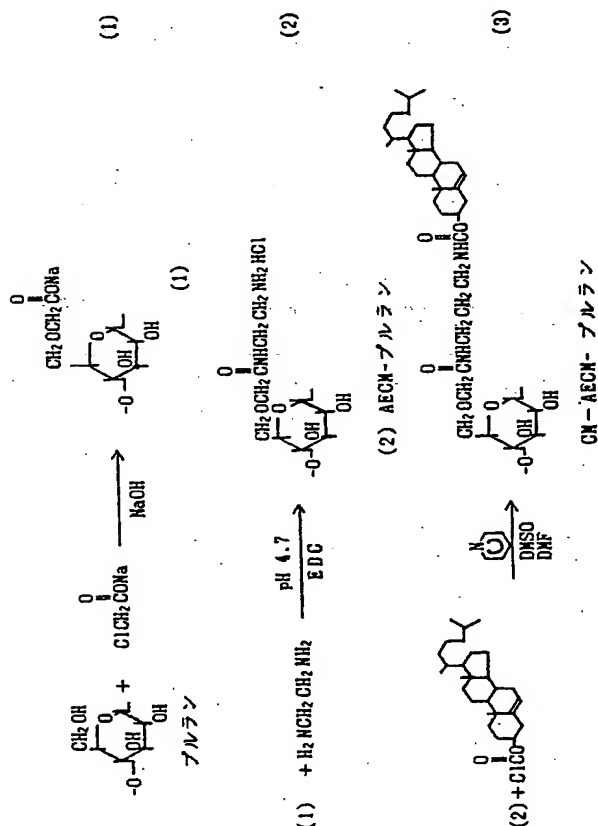
テロール誘導体を多糖類の100単糖残基あたり0.5-3.0置換する。コレステロール誘導体の代りにパルミトイル基のごとき長鎖脂肪酸を置換することによっても該初期目的はほぼ達成されるが、本研究者らの種々の角度からの検討結果では、コレステロール誘導体を置換したものの方が、単純な長鎖脂肪酸による置換よりもリボソームの構造強化に対してより優れた効果を発揮する。(特願昭59-189746参照)

多糖類としては水溶性の天然由来多糖のほとんどが利用できるが、糖骨格のヒドロキシル基の化学反応性から予想されるごとく第2級ヒドロキシル基よりも第1級ヒドロキシル基を多く残している多糖類の方がより容易に置換することが出来る。即ち、プルラン、アミロペクチン、アミロース、マンナン、デキストラン、およびイヌリンのごとき多糖類のうちではデキストランがもっとも置換における反応性が乏しい。また、検討した多糖類の

中でもマンナン、アミロペクチンのごとき多糖類は、多糖類自身がどん食細胞と特異的に相互作用するため、本発明における該目的達成のためにはリボソームへの相互作用が強く、リボソームの構造安定性には優れているが、むしろ多糖自身の構造に由来する細胞認識性の乏しいプルランあるいはアミロースが優れている。

#### 実例1：多糖誘導体の合成

多糖類のリボソーム側への相互作用サイトとして機能するコレステロール誘導体残基の置換は、本発明者自身が開発した方法(特願昭59-189746参照)に従って行なう。数平均分子量50,000のプルランについてその方法を述べる。反応は式(1)から(3)に至る過程に従って行なう。



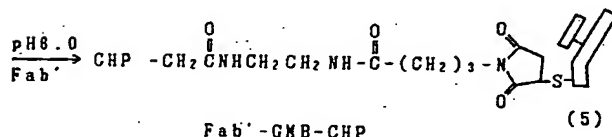
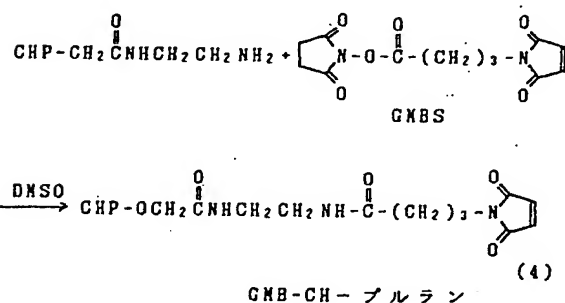
プルラン(数平均分子量50,100)3gを1.35 M (= Mol · dm<sup>3</sup>)モノクロロ酢酸ソーダ水溶液の37.0ml中に溶解し、10規定苛性ソーダ10.0mlを加え、蒸留水で50.0mlに希釈する。えられた混合物水溶液を30℃で6時間攪拌、これに1 M 第二りん酸ナトリウム水溶液の5.0mlを加え、ついで5規定塩酸水溶液でpH 7に調整し、反応を停止させる。この溶液をギンスキング社製シームレスセルローズ透析チューブに移し、1ℓのトルエン飽和水溶液中室温で透析、モノクロロ酢酸および無機塩類を完全に除去する。ここで得られた透析処理溶液を50mlまで濃縮し、これにエチレンジアミン・2塩酸塩の4.0gを加え、ついで1規定苛性ソーダ水溶液でpH 4.7に調節する。つぎに1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩( $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{HCl}$ ) 0.72gを加え、30℃で6時間攪拌する。えられた溶液を再び上記と同じ透析チューブ中に移し、0.2 M

-食塩水溶液1ℓ中2日間透析し低分子量の無機有機共雑物を除去する。透析後、凍結乾燥することにより収量2.85gで100グルコース単位あたり4.8個のアミノエチルアミノカルボキシメチル基(AECM基)の結合したプルラン(AECM-プルラン)がえられる。えられたものの元素分析値はつぎの通りである。実測値: C, 44.5%; H, 6.25%; N, 0.81%。

上記操作でえられたAECM-プルランの1.0gを50ml量ナス型フラスコに入れ、乾燥ジメチル硫酸の30.0mlを加え油浴上80℃に加熱、多糖を完全の溶解する。ついで無水ピリジンの5.0mlに予め無水シメチルホルムアミド10.0mlに0.8gのクロロ蠟酸コレステロールエステルを溶解した溶液を加え、更に80℃で2時間攪拌を続ける。室温まで冷却後エタノールの300mlを加えると沈殿物が析出する。この沈殿物を減圧口過により分離し、エタノールの100mlおよびエチルエーテルの100mlで洗浄

する。最後に100℃で5時間減圧乾燥することにより収量0.85gで、100グルコースあたり1.5個のコレステリルオキシカルボニルアミノエチルカルボキシメチル基を有するプルラン(CH(1.5)-AECM(4.8)-プルラン-50)がえられる。コレステロール基の置換量は、既に確立した方法(特願昭59-189746参照)によりプロトンNMRにおけるコレステロール水素の積分値より求める。

ついで、このものにマレイミド基の導入を行う。



GMB = γ-マレイミドブチロキシサクシンイミジル

CHP = CH-プルラン

即ち120.0mgの上でえられたCH(1.5)-AECM(4.8)-プルラン-50と20.0mgのγ-マレイミドブチロキシサクシンイミジル(以下GMBと省略)を10.0mlのジメチルスルホキシドに溶解し、約15℃で52時間反応させる。反応液を室温で200mlのエタノール中に注ぎ、一夜放置後口過、えられる沈殿を70℃で減圧乾燥する。これより式(4)に示されるごとくAECM基の約80%がマレイミド基で置換されたコレステロールプルラン(GMB-CH-プルラン)の87mgがえられる。

#### 実例2: 多糖被覆リボソームの調整

リボソームは、既に本発明者らにより確立された方法(特願昭58-147587参照)に従っ

て卵黄レシチンから薄膜法により調整した。即ち卵黄レシチン30.9mgをクロロホルムの数mlに溶解し、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下薄膜を形成させる。えられた薄膜をフラスコごと減圧デシケータ中で充分乾燥させる。ついでPBS緩衝液(pH 7.4)の4.0mlで膨潤させ、ボルテックスミキサーを用いて薄膜を振とう削離する。えられた乳濁液に0℃でプローブ型超音波発信機を用いて25Wで10分間超音波を照射することにより、リボソーム分散液をえる。えられたリボソームの評価のための放射性同位体標識のためには、

[14C]-ジバルミトイルホスファチジルコリンのエタノール・トルエン(1:1容量)溶液の20μl(0.1μCi/μmol脂質)を上記リボソーム分散液の4.0mlに加え、再度ボルテックスミキサーで穏やかに振とうする。ついでえられたリボソーム分散液の0.50ml(3.75mgのレシチンを含む)に、別途合成したGMB-CH-プルラン-50の0.50mgを加え、本発明者に

より確立している方法（特願昭59-189746参照）によって、20℃を超えないように温度を調節しながら2時間かきまぜ、リボソーム表面へのブルランの被覆を完了する。

### 実例3：多糖被覆リボソームへのモノクローナル抗体のFab'フラグメントの結合

先ず、市販されているモノクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントからFab'フラグメントを得るためにはつぎの方法を用いる。一例として抗マウス抗体を用いたときの方法について述べる。

抗マウスモノクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメント（Cappel社、タンパク含量27.3mg/ml、抗体含量6.0mg/ml）を含む水溶液の25.0μlとマーカーとして用いる<sup>125</sup>I-標識ヒツジ抗ヒトモノクローナル抗体（Amersham Japan社、同位体元素含量940,000cpm/40μl）を含む水溶液の30.0μlを5mMのEDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH6.0）の0.45ml中に加える。更にこれを0.2M（ジチオスレイトール

す。構成されるリボソームの想像図を第4図に示す。

実例1の結果としての第1図に示すごとく、モノクローナル抗体のFab'フラグメントはF(ab')<sub>2</sub>フラグメントからゲルクロマトグラフィーにより効率よく単離することが出来る。ついで実例2の第2図から明らかなように、単にリボソームとモノクローナル抗体Fab'フラグメントのみをインキュベーションしても、リボソーム表面へのタンパクの結合は全く見られず、ゲルクロマトグラフィーによっても両者は別々に分離して溶出される。しかるに第3図に示すごとく、モノクローナル抗体のFab'フラグメントとの接合手としてのGMB残基を有する多糖で表面を被覆したリボソームでは、モノクローナル抗体のFab'フラグメントとインキュベーションすることにより反応が進行し、反応後の生成物のゲルクロマトグラフィーにおいて、リボソーム画分（即ちセファローズ4Bを用いたクロマトグ

ラフィー）の50.0μlを加える。これを25.0℃で90分間かきまぜた後反応後の全量をセファローズG-25のカラム（径10mm×長300mm）を用いて0.1Mリン酸緩衝液（5mM EDTAを含む、pH6.0）により展開、ジチオスレイトールを分離除去して抗体のFab'フラグメントを単離する。結果の実例を第1図に示す。

実例2で得られたGMB-CH-ブルラン-50被覆リボソームの分散液0.70mlに、上で得られた抗マウスモノクローナル抗体のFab'フラグメントを含む画分約1.0mlを加える。得られた混合溶液を20-25℃で約12時間攪拌する。反応液をセファローズ4Bのカラム（径18mm×長400mm）を用いて5mM EDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH6.0）で展開する。これにより式(5)に示す反応に従って、第1図～第3図の結果から明らかなように、モノクローナル抗体のFab'フラグメントが結合した多糖で被覆されたリボソームをえることが出来る。結果の実例を第1図および第3図に示

ラフィーでは15-20番目のファンクション）にFab'の溶出が確認され、リボソーム表面に組織指向性サイトとしてのモノクローナル抗体のFab'フラグメントが確実に修飾できたことを示している。このようなモノクローナル抗体のFab'フラグメントが共有結合した多糖により被覆したリボソーム構造は、第4図のごとく書き表わすことのできるものと考えられる。

### 【本発明の評価】

本発明により完成された新規なモノクローナル抗体のFab'フラグメントリボソームが該目的のごとく特異抗体と結合することは下記の方法により実証した。

常法に従ってクロマトグラフ的に純粋なヒトIgG（Cappel社）をシアン化ブロムを用いて1デスク当たり5.0μgに相当するようにペーパーディスクに結合する。このとき対照として同じくクロマトグラフ的に精製されたウマIgG（Cappel社）もペーパーディスクに結合する。マイクロテスト

プレート (Falcon社) のWell内に、上で作成した抗体結合ディスクと検体の 100 $\mu$ lを入れて 0.4 $^{\circ}$ C で一夜インキュベーションする。翌朝ディスクを PBS緩衝液の 200 $\mu$ lを 5回洗浄した後、Well型シンチレーションカウンターを用いてディスクのラジオアイソトープ含量を測定する。抗体活性は全カウント数に対するディスクのカウント数の 100分率で表わす。試料としての抗ヒトマウスモノクローナル抗体の F(ab')<sub>2</sub> フラグメント、同抗体の Fab' フラグメント、および同 Fab' フラグメントを結合したブルランで被覆した卵黄レシチンリポソームのそれぞれについて評価した結果の一例を表 1 に示す。

表 1 の結果を得るに使用したリポソームは、分子量 50,000 のブルラン 1 分子当り 0.043 個のモノクローナル抗体 Fab' フラグメントが結合されて居り、直径 1080 $\text{\AA}$  のリポソームの 1 個には平均 4.1 個の Fab' が結合されている。このことを考慮するならば、今回用いたリポソームでは表面に結合された Fab' フラグメントの数が多い

ため、抗ヒト IgG への結合に際しての立体障害が顕現され、見掛け抗体活性が低下したように見られたものと考えられる。いずれにせよ、本発明者らはここに評価されたごとく、リポソームの構造強化のために被覆した多糖誘導体へ直接モノクローナル抗体 Fab' フラグメントを共有結合させることを完成させた。衆知のごとくりポソームは親水性、疎水性物質のいかに拘らずカプセル化することが出来、本発明者らが今回発明させたりポソームも制ガン剤や診断試薬をはじめとする各種薬物をカプセル化することが勿論可能である。即ち、該発明になる新規リポソームの製造法は疾病の治療および診断に際する組織指向性薬物運搬体として、リポソームの利用の途をさらに広げるものである。

表 1 リポソーム結合 Fab' の抗体活性評価

試料	全ラジオアイソトープ カウント数 (1) cpm	抗体結合ディスク への結合量		(2)-(3) (1) %
		抗ヒト IgG (2) cpm	抗ウマ IgG (3) cpm	
抗ヒトマウスモノクローナル抗体の F(ab') <sub>2</sub> フラグメント	3779	520	17	9.0
同上 Fab' フラグメント	1372	556	217	33.0
同上 Fab' フラグメント 結合卵黄レシチン リポソーム	1875	216	130	5.0

## 4. 図面の簡単な説明

第 1 図はモノクローナル抗体フラグメント (Fab' および F(ab')<sub>2</sub>) のセファデックス G-25 カラムでの流出曲線である。

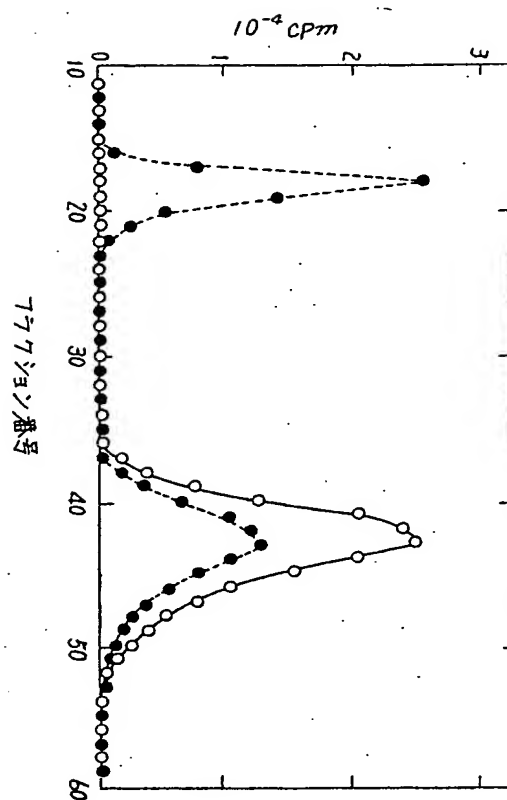
第 2 図は [<sup>14</sup>C]-ジバルミトイルホスファチジルコリンで標識したリポソーム (…●…) と I 標識 Fab' (—○—) のセファローズ 4 B カラムの流出曲線である。

第 3 図は [<sup>14</sup>C]-ジバルミトイルホスファチジルコリンで標識した GMB-CH-ブルラン-50 被覆リポソーム (…●…) と I 標識 Fab' (—○—) のセファローズ 4 B カラムの流出曲線である。

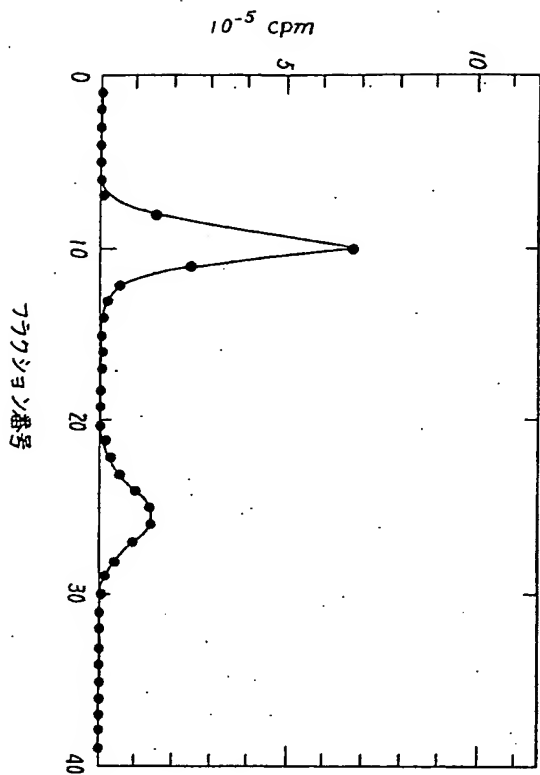
第 4 図はモノクローナル抗体 Fab' フラグメントを結合した多糖で被覆したリポソームの仮想図である。

代理人 内 田 明  
代理人 萩 原 亮 一

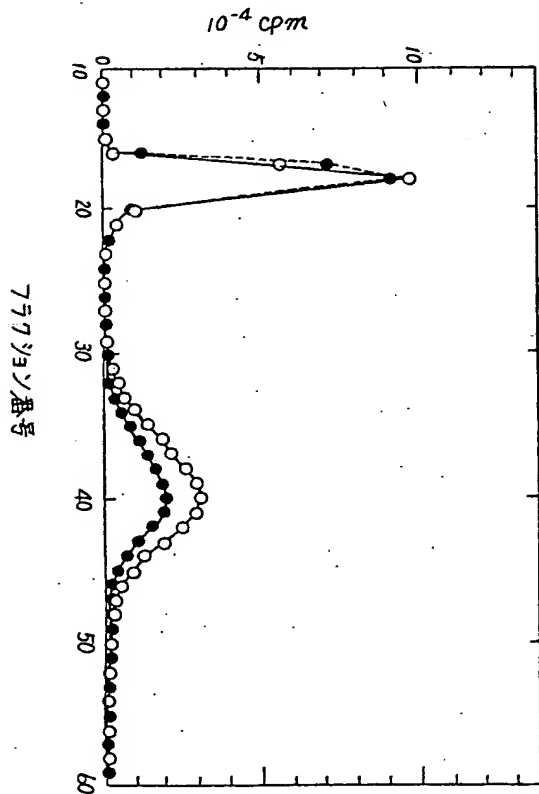
第2図



第1図



第3図



第4図

